

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-38763

(43)公開日 平成6年(1994)2月15日

(51)Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/31				
15/80	Z N A			
// (C 1 2 N 15/31				
C 1 2 R 1:645)		8931-4B	C 1 2 N 15/ 00	A
			審査請求 未請求	請求項の数 5 (全 19 頁)

(21)出願番号 特願平5-77367

(22)出願日 平成5年(1993)3月12日

(31)優先権主張番号 特願平4-88418

(32)優先日 平4(1992)3月13日

(33)優先権主張国 日本(JP)

(71)出願人 000000033

旭化成工業株式会社

大阪府大阪市北区堂島浜1丁目2番6号

(72)発明者 松田 昭生

静岡県富士市鮫島2番地の1 旭化成工業株式会社内

(72)発明者 村松 周治

静岡県富士市鮫島2番地の1 旭化成工業株式会社内

(74)代理人 弁理士 清水 猛 (外1名)

(54)【発明の名称】 セファロスポリンC生合成に関与する遺伝子を含むDNA断片

(57)【要約】

【目的】 本発明は、アクレモニウム・クリソゲナム由来であり、セファロスポリンC生合成に関与する遺伝子を単離し、アクレモニウム・クリソゲナムの改良にこれを利用することを目的とする。

【構成】 セファロスポリンC生合成に関与する遺伝子群を含有するDNA断片であり、少なくとも配列表に示されるアミノ酸配列をコードする新規な遺伝子を含有するDNA断片。

1

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 アクレモニウム・クリソゲナム由来であり、セファロsporin C 生成に関与する遺伝子を含む DNA 断片。

【請求項2】 イソペニシリン N 合成酵素遺伝子の近傍に位置し、図3に示す制限酵素地図により規定される請求項1記載の DNA 断片。

【請求項3】 配列表（配列番号1）に示すアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする遺伝子を含む請求項1または2記載の DNA 断片。

【請求項4】 配列表（配列番号2）に示すアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする遺伝子を含む請求項1、2または3記載の DNA 断片。

【請求項5】 図3における PstI ③-EcoRV ④間の塩基配列が配列表（配列番号3）で示される請求項1、2、3または4記載の DNA 断片。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、アクレモニウム・クリソゲナム由来であり、セファロsporin C 生成に関与する遺伝子を含む DNA 断片に関する。

## 【0002】

【従来の技術】临床上重要なセファロsporin 系抗生物質の出発原料であるセファロsporin C は、糸状菌であるアクレモニウム・クリソゲナムを用いた発酵法により製造されている。従来、該菌のセファロsporin C 生産能力を向上させるために用いられてきた技術は、突然変異生成、それに続く高生産株のランダムスクリーニングであった。しかし、近年、該菌を宿主とする形質転換系の開発〔例えば、Queener ら、Microbiology 1985, American Society for Microbiology, (1985) 468-472〕およびセファロsporin C 合成酵素遺伝子のクローニングが相次いで行われ、優良菌株の育種に遺伝子工学的アプローチが施す道が開けてきた〔例えば、Skatrud ら、BIO/TECHNOLOGY (1989) 7, 477〕。セファロsporin C は、アクレモニウム・クリソゲナムにおいて、3種のアミノ酸を出発原料として、5種類の酵素による6ステップの反応を経て生合成されることが知られている。

〔例えば、Martin ら、Trends in Biotechnology (1985) 3: 39-44 参照〕。現在までに、これら生合成酵素のうち4種の酵素をコードする遺伝子がそれぞれアクレモニウム・クリソゲナムよりクローニングされ、〔例えば、Samon ら、Nature (1985) 318, 191、Samson ら、BIO/TECHNOLOGY (1987) 5, 1207、Gutierrez ら、Journal of Bacteriology (1991) 173, 2354-2365、EP0450758〕分子育種に応用されつつある。しかしながら、第3番目のステップ、すなわち、イソペニシリン N からペニシリン N への異性化反応を触媒する酵素であるイソペニシリン N エピメラーゼをコードする遺伝子（以後 IPNE 遺伝子と略す）は未だ単離同定されていない。また、アクレモニウ

2

ム・クリソゲナムには、セファロsporin C 生成に間接的に関与する遺伝子（例えば、セファロsporin C 合成遺伝子群の発現制御に係わるタンパク質、あるいは合成中間体の膜透過に係わるタンパクをコードする遺伝子）が複数存在することが予想され、上記生合成酵素遺伝子と同様に、これらの遺伝子もセファロsporin C 生産菌の分子育種に有益な手段を提供すると考えられる。しかしながら、IPNE 遺伝子と同様これら遺伝子の解析は全く行われていない。

## 10 【0003】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、アクレモニウム・クリソゲナム由来であり、セファロsporin C 生成に関与する遺伝子を単離し、アクレモニウム・クリソゲナムの改良に、これを利用することを目的とする。

## 【0004】

【課題を解決するための手段】抗生物質の生合成に関与する遺伝子群は、一般にクラスターを形成しているという知見〔例えば、Martin ら、Annu. Rev. Microbiol. (1989) 43, 173-206〕に基づいて、本発明者らは、既知のセファロsporin C 合成酵素遺伝子近傍の DNA 断片を単離し、遺伝子破壊法を利用することによって、該断片上に存在する遺伝子の機能を解析した。その結果、イソペニシリン N 合成酵素遺伝子の近傍に位置し、図3に示す制限酵素地図を有する DNA 断片上に、セファロsporin C 生成に関与する遺伝子が少なくとも2個存在していることを見だし、本発明を完成するに至った。すなわち、本発明は、

20 【0005】(1) アクレモニウム・クリソゲナム由来であり、セファロsporin C 生成に関与する遺伝子を含む DNA 断片。

(2) イソペニシリン N 合成酵素遺伝子の近傍に位置し、図3に示す制限酵素地図により規定される(1)記載の DNA 断片。

(3) 配列表（配列番号1）に示すアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする遺伝子を含む(1)、(2)記載の DNA 断片。

(4) 配列表（配列番号2）に示すアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする遺伝子を含む(1)、(2)、(3)記載の DNA 断片。

40 (5) 図3における PstI ③-EcoRV ④間の塩基配列が配列表（配列番号3）で示される(1)、(2)、(3)または(4)記載の DNA 断片に関する。

【0006】また、本研究の過程で、本発明 DNA 断片の一部をプローブとして使用することにより、配列表（配列番号1）に示すアミノ酸配列を有するタンパク質および配列表（配列番号2）に記載した配列からなるタンパク質を、それぞれコードする2種の cDNA が得られた。各々代表的なクローンに由来する塩基配列を配列表（配列番号1および2）に示した。これら cDNA 化合物もアクレモニウム・クリソゲナム内で機能するプロモータ

一断片（例えば、特開平4-58891）と連結させることにより、本発明DNA断片と同様、アクレモニウム・クリソゲナムの改良に利用できると考えられる。したがって、図3に示す制限酵素地図により規定されるDNA断片から転写されるRNA（セファロsporin C生成に関与するタンパクをコードする m-RNA）に由来する cDNA 化合物群も本発明に包含される。本発明に係る DNA断片は、大略下記の工程によって造成することができる。

- 【0007】(1) アクレモニウム・クリソゲナムから染色体DNAを抽出し、適当な制限酵素（例えば、MboI等）で部分分解する。  
 (2) (1)で得られたDNA断片を適当なベクターに組み込み、アクレモニウム・クリソゲナムの染色体DNAライブラリーを構築する。  
 (3) (2)で得られたライブラリーの中から、合成DNAプローブを用いたハイブリダイゼーションにより、イソペニシリンN合成酵素遺伝子の少なくとも一部を含むクローンを単離する。  
 (4) 該クローンより組換えDNAを抽出し、制限酵素解析、サザンハイブリダイゼーション等を行ってイソペニシリンN合成酵素遺伝子の存在位置を確認した後、その下流域（ACVS遺伝子の反対側）を適当なプラスミドベクター（例えば、pUC18）にサブクロニングする。  
 (5) (4)でサブクロニングされたDNA断片上で、RNAに転写される領域（機能的遺伝子）を同定する。  
 (6) 相同組換え現象を利用した遺伝子破壊法により、(5)で同定した領域内に変異を有するアクレモニウム・クリソゲナム株を取得する。  
 (7) 上記(6)で得た変異株のセファロsporin C生産能を調べ、親株のそれと比較することにより、本遺伝子がセファロsporin C生成に関与していることを確認する。

【0008】上記の工程中でDNA、組換え体宿主としての大腸菌等の取扱いに必要な一般的な操作は、当業者間で通常行われているものであり、例えば、Maniatisらの実験操作書（T. Maniatis et al., Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory 1982, 1989）に従えば容易に実施できる。使用する酵素、試薬類もすべて市販の製品を用いることができ、特に断わらない限り、製品で指定されている使用条件に従えば、完全にそれらの目的を達成することができる。上記(1)において、DNA抽出源としては、アクレモニウム・クリソゲナムATCC11550、アクレモニウム・クリソゲナムIS-5等の菌株が使用できる。なお、アクレモニウム・クリソゲナムIS-5株は、平成2年2月5日付けで通商産業省工業技術院微生物工業技術研究所に微工研菌第11232号の寄託番号で寄託されている。

【0009】また、該菌からの全DNA抽出は、例えば、Johnstoneら（Johnstone et al., EMBO Journal (19

85)4 1307-1311]の方法、もしくは、Minuthら [Minuth et al., Current Genetics(1982)5: 227-231]の方法に準じて行うことができる。上記(2)におけるベクターとしては、例えば、EMBL3, EMBL4 (STRATAGENE社)等のラムダファージベクターもしくは、pHC79 (Bethesda Research Laboratories <BRL>社)、pBSFPM6 (後述)等のコスミドベクターを使用することができる。上記(3)で使用するプローブは、既に明かとなっている A. chrysogenum由来のIPNS遺伝子の配列に基づいて設計し、市販の合成機を用いて容易に合成することができる。上記(5)における転写領域は、例えば、(4)で得たプラスミドから適当な制限酵素断片を調製し、該断片を放射能ラベルしたものをプローブとして、アクレモニウム・クリソゲナムから抽出したRNAとのノーザンハイブリダイゼーションを行うことによっておおまかに推定することができる。あるいは、アクレモニウム・クリソゲナムに由来するラベル化 cDNA をプローブとして、(4)で得たプラスミドの制限酵素分解物とのサザンハイブリダイゼーションを行うことによっても推定できる。また、該制限酵素断片をプローブとしてアクレモニウム・クリソゲナム由来の cDNA クローンを単離し、その構造を決定することによって、さらに細かく転写領域ならびにタンパク質コード領域等を限定することも可能である。なお、アクレモニウム・クリソゲナムからのRNAの抽出は、例えば、EP-0450758記載の方法に準じて行うことができる。また、cDNAライブラリーの構築、ノーザンハイブリダイゼーション等の操作も、例えば、上記マニアティスらの実験操作書に準じて行うことができる。上記(6)における遺伝子破壊は、例えば Hoskinsらの方法 [Jo Ann Hoskinsら, Curr Genet (1990)18:523-530] に準じて行うことができる。なお、本発明者らは、まずセファロsporin Cアセチルトランスフェラーゼ遺伝子の破壊実験を試み、後述の参考例に示すとおり、該菌においても、特定の遺伝子の破壊は比較的容易に取得できることを見いだした。なお、遺伝子破壊用プラスミドを構築する際必要となる選択マーカー遺伝子としては、例えば特開平4-58891に記載されている、アクレモニウム・クリソゲナム内で作用するプロモーターに連結されたハイグロマイシンBホストトランスフェラーゼ遺伝子、あるいはネオマイシンホストトランスフェラーゼ遺伝子等を使用することができる。また、破壊用プラスミドによるアクレモニウム・クリソゲナムの形質転換も公知の方法に準じて行うことができる [例えば、Queenerら, Microbiology 1985, American Society for Microbiology (1985) 468-472]。上記(7)におけるセファロsporin C濃度は、例えば、Martinezらが記載した方法 [E yme Microb. Technol. (1985)7, 389-393] に準じて測定することができる。

【0010】以下、実施例により本発明を詳述するが、

本発明は、該実施例によって限定されるものではない。なお、実施例、参考例に記載の略称ないし略号は、以下のとおりのものである。

【0011】マニアティスの実験書：(T. Maniatis et al., Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory 1982)

N-3シード培地：コーンステイープリカー40g/ビート20g/酢酸アンモニウム2g/スイトース40gを水1リットルに溶解したもの。

【0012】メイン培地：ビート30g/脱脂大豆40g/コーンステイープリカー10g/酢酸アンモニウム5g/硫酸アンモニウム7g/硫酸カルシウム8g/炭酸カルシウム15g/スイトース60g/メチルオレイト41.5を水1リットルに含むもの。

【0013】CM培地：ショ糖20g/リン酸二水素カリウム0.5g/リン酸水素二カリウム0.5g/塩化カリウム0.5g/硫酸マグネシウム(7水塩)0.5g/硫酸鉄(II)(7水塩)0.01g/硝酸ナトリウム3g/イーストエキストラクト4g/ペプトン10gを水1リットルに溶解したもの。

CM固形培地：1.5%の寒天を含有するCM培地。

【0014】GAG培地：グリセロール40g/アスパラギン4g/塩化カルシウム0.1g/塩化ナトリウム0.1g/微量金属溶液〔硫酸マグネシウム(7水塩)4g/硫酸鉄(II)(7水塩)0.4g/硫酸マンガン(4水塩)0.16g/硫酸亜鉛(7水塩)0.4g/無水硫酸銅0.04gを水1リットルに溶解したもの〕25ミリリットル/0.1Mリン酸バッファー(pH7.0)30ミリリットルを水1リットルに含有する培地。

【0015】P-バッファー：0.6M塩化カリウム/0.01M塩化マグネシウム/0.025M塩化カルシウム

PEG溶液：25%ポリエチレングリコール(〜4000)/0.01Mトリス(pH8.0)/0.05M塩化カルシウム/0.6M塩化カリウム。

6×SSC：0.9M塩化ナトリウム/90mMクエン酸ナトリウム。

20×SET：3M塩化ナトリウム/0.4Mトリス(pH7.8)/20mMEDTA。

【0016】20×SSPE：塩化ナトリウム210g/リン酸二水素ナトリウム(2水塩)31.2g/0.5MEDTA40ミリリットルを水1リットルに溶解したもの。

50×デンハルツ：フィコール5g/ポリビニルピロリドン5g/牛血清アルブミン5gを水0.5リットルに溶解したもの。

【0017】(参考例1)

デアセチルセファロsporinCアセチルトランスフェラーゼ(DCPC-ATF)遺伝子の破壊

a. pDATF1の構築：図1に示される工程に従って、アクレモニウム・クリソゲナムのDCPC-ATF遺伝子を破壊するためのプラスミドpDATF1を構築した。

【0018】以下に各工程を説明する。まず、pATF1をSpeIで切断しDCPC-ATF遺伝子を含む3.7Kbの断片を分離精製した。該断片とXbaIで切断し、アルカリフォスファターゼ処理を施したpUC18(宝酒造販)とをT4リガーゼで連結することによりpSATF1を得た。次いで、pSATF1のEco47III(この制限酵素認識部位はpSATF1上のDCPC-ATF遺伝子内部に一箇所だけ存在する)部位に、XbaIリンカーを挿入することによりpSATF1Xを得た。一方、pACTHY83をSpeI, XbaIで切断し、3.2KbのハイグロマイシンBホストトランスフェラーゼ発現単位断片(アクレモニウム・クリソゲナム由来アクチン遺伝子のプロモーターおよびターミネーター、細菌由来のハイグロマイシンBホストトランスフェラーゼ遺伝子がアクレモニウム・クリソゲナム内での発現に好適な配置で結合した断片)を分離精製した。次いで、該断片とXbaIで切断し、アルカリフォスファターゼ処理を施した上記pSATF1XをT4リガーゼで連結することによりpDATF1を得た。なお、本参考例で使用したpATF1は、アクレモニウム・クリソゲナム由来DCPC-ATF遺伝子ならびにデアセチルセファロsporinC合成酵素/デアセチルセファロsporinC合成酵素(アクレモニウム・クリソゲナムの場合、単一のポリペプチドが両酵素活性を有していることが明かとなっている)遺伝子を含む7KbのBamHI断片がpUC18に挿入されたプラスミドであり、その造成法は、EP0450758に記載されている。また、pACTHY83は上述のとおりハイグロマイシンBホストトランスフェラーゼ発現単位を有するアクレモニウム・クリソゲナム形質転換用ベクターであり、その造成法は、EP0450758に記載されている。

【0019】b. pDATF1によるアクレモニウム・クリソゲナムの形質転換；pDATF1をSacIで線状化した後、アクレモニウム・クリソゲナムIS-5株由来のプロトプラストに導入し、ハイグロマイシンBに耐性となった形質転換体を取得した。以下にその詳細を説明する。

【0020】CM固形培地上で30℃5日間生育させたアクレモニウム・クリソゲナムIS-5の菌糸体をCM培地50ミリリットルに接種し、回転式振とう機(250r.p.m)上、30℃で3日間培養した。さらに、該菌液1ミリリットルを50ミリリットルのGAG培地に接種して、30℃で20時間培養した。得られた培養液50ミリリットルを3500r.p.mで10分間遠心し、菌糸体を沈澱させた後、0.9%のNaClリットル溶液で洗浄し、0.01Mジチオスレイトールを含んだマクイルベイン緩衝液(0.1Mクエン酸、0.2Mリン酸ナトリウム、pH7.3)20ミリリットルに懸濁し、30℃で1時間、おだやかに振とうした。次いで菌糸体を3200r.p.m、10分間の遠心で沈澱さ

せ、P-バッファーで洗浄した後、ノボザイム (Novo社) を10mg/ミリリットルの濃度で含有するP-バッファー10ミリリットルに懸濁し、30℃で1時間おだやかに振とうした。該反応液を800 r. p. mで30秒間遠心して得た上清を、濾紙 (TOYOFILTER PAPER 5A) を用いて濾過することにより、菌糸体とプロトプラストを分離した。

【0021】次いで、該濾液を3000 r. p. mで5分間遠心し、プロトプラストを沈澱させた後、P-バッファーで1回洗浄し、プロトプラストが $3 \times 10^8$  個/ミリリットルの濃度となるようにP-バッファーに懸濁した。かくして得られたプロトプラスト懸濁液0.1ミリリットルに、SacI切断により線状化したpDATF1 10μgを含む溶液10μリットルを加えた後、0.05ミリリットルのPEG溶液を加え、かるく混合した。該混合液を氷上に25分間静置した後、同上のPEG溶液を1ミリリットル加えて、室温でさらに30分間静置した。かくして得られた形質転換プロトプラスト懸濁液を0.2ミリリットルずつプロトプラスト再生培地〔文献 (イソガイら: Agric. Biol. Chem. 1987, 51, 2321-2329) に記載されているBRM培地〕を25ミリリットル含有するプレート上に広げ15℃で20時間培養した。

【0022】次いで、該プレートに4.5mgのハイグロマイシンBを含み、50℃に保温した同上のBRM培地5ミリリットルを重ねた後、28℃で14日間培養した。その結果、ハイグロマイシンBに耐性となった形質転換体 (以下、HYB形質転換体と略す) が二百数十株出現した。

【0023】c.破壊株の選択: DCPC-ATFはセファロsporin C生合成経路の最終ステップ、すなわち、デアセチルセファロsporin Cをセファロsporin Cに変換する反応を触媒する酵素である。したがって、この遺伝子が破壊された株はセファロsporin C生成能を消失するはずである。上記 (2) で得たHYB形質転換体より12株をランダムに選択し、その各々をN3シード培地50ミリリットルに接種し、25℃で3日間振とう培養した (220 r. p. m)。得られた培養液1ミリリットルをメイン培地30ミリリットルを含む500ミリリットルのフラスコに移植し、25℃で4日間振とう培養した。かくして得られた培養液を遠心分離して得た上清を10倍希釈した後、高速液体クロマトグラフィーに供し、セファロsporin Cの検出を行った。高速液体クロマトグラフィーのカラムは、ZORBAX-BPN H2カラム (デュボン社製) を用い、移動相としては4%酢酸、4%メタノール、8%アセトニトリルからなる溶液を用いて、流速は2ミリリットル/分、検出波長は245 nmで行った。その結果、調べた12株中2株の形質転換体 (DAT2及び DAT8 と命名) がセファロsporin C生成能を失っていることが明らかとなった。そして、

これら2株はDCPC-ATFの基質であるデアセチルセファロsporin Cを親株より多く蓄積した。また、予想どおり DAT2, DAT3の細胞破碎液中にDCPC-ATF活性は全く検出されなかった。

【0024】d. サザン法によるDCPC-ATF遺伝子破壊の確認; 上記 DAT2, DAT8株およびその親株である IS-5 株からリーダー、ブローダの方法 [U. Raeder & P. B. Roda, Letters in Applied Microbiology (1985) 1, 17-20] に従ってDNAを抽出し、SpeIもしくは BamHIでの切断、また StuI と XhoI による二重切断を行った。ついで、これら切断DNAをアガロースゲル電気泳動した後、サザン法によりナイロンフィルター (ハイボンド N) に転写し、放射能ラベルした pCCS1の EcoRI断片 (DCPC-ATFの全コード領域を含む 1.25kb の cDNA断片) とのサザンハイブリダイゼーションを行った。その結果、DAT8株では染色体のDCPC-ATF遺伝子と pDATF1 上の破壊されたDCPC-ATF遺伝子とが2重交叉により、期待どおり置換されていることが示された。すなわち、DAT2, DAT8 株ではSpeIによる切断で6.9Kb, BamHI で5.5Kb と3.2Kb, StuI+XhoI による切断では5.9Kbの断片がそれぞれ該プローブとハイブリダイズし、親株で観察された位置 (SpeI-3.7Kb, StuI+XhoI-2.7Kb, BamHI-7Kb) にハイブリダイゼーションシグナルは全く認められなかった (図2)。以上の結果、アクレモニウム・クリソゲナムにおいても特定遺伝子の破壊が比較的容易に達成できることが判明した。

#### 【実施例】

##### 【0025】(実施例1)

IPNS遺伝子を含むコスミドクローンの単離

- a. 遺伝子ライブラリーの作製; アクレモニウム・クリソゲナム IS-5 株 (微工研菌寄第11232号) の全DNAを特願平2-166566に記載した方法で抽出した。このDNA約100 μgをMboIで部分消化した後、10~40%のショ糖密度勾配遠心法による分画操作を行って、30~40KbのDNA断片15μgを得た。該断片3μgとBamHIで切断し、アルカリホスファターゼ処理を施したコスミドベクターpBSF PKM6 1μgとをT4リガーゼで連結した後、パッケージングエクストラクト (STRATAGENE社) を用いて入ファージ粒子内に封入した。かくして得た組換えコスミド懸濁液を適当に希釈し、E. coli HB101 (ATC C3694) に感染させ、アンピシリン (100μg/ミリリットル) を含むLBプロス寒天培地上に出現するコロニー数を計測した。その結果、この懸濁液は、 $2 \times 10^6$  個の組換えコスミド粒子を含むことが判明した。このファージ液をアクレモニウム・クリソゲナムの遺伝子ライブラリーとして保存した。なお、ここで使用したベクター pBSFP KM6 は pBSFPKM5 (該コスミドベクターの造成法は特願平2-219032に記載されている) をSfiIで切断し、DNAポリメラーゼクレノウ (Klenow) 断片と4種のデオキシヌクレオチド3リン酸を用いて平滑化した部

位に、BamHI リンカー（宝酒造：5'CCGGATCCGG3'）を常法によって挿入することにより作製した。

【0026】b.プローブの調製；S.M.Samsonらの報告〔Nature. 318,191(1985)〕をもとに次の列を有するDNAオリゴマー：5'CTCCTTGTCATCGCCGAATAGG3'を自動DNA合成機（アプライド・バイオシステム社のDNAシンセサイザー・モデル380-A）を用いて、常法どおり合成した。次いで、該DNAオリゴマーの5'末端をT4ポリヌクレオチド・キナーゼと〔 $\gamma$ -32P〕ATPを用いて放射能ラベルした。これをIPSプローブと称し、ハイブリダイゼーション実験に供した。

【0027】c.ハイブリダイゼーションによるスクリーニング；a.で得たライブラリーの一部をE.coli HB101に感染させ、アンピシリン（シグマ社）100  $\mu$ g/ミリリットルを含むレーブロス寒天培地上に約10000個のコロニーとして生育させた後、これらをワットマン541濾紙へ移した。ついで、0.5N NaOH/1.5M NaClで処理して溶菌及びDNA変性を行い、0.5M Tris-HCl (pH7.0)/1.5M NaClにより中和した後、上記IPSプローブとハイブリダイゼーションさせた。ハイブリダイゼーションは、6 $\times$ SET,0.5%ノニデットP-40（シグマ社）、0.1mg/ミリリットル変性サケ精子DNAおよび終濃度1 $\times$ 10<sup>6</sup> cpm/ミリリットルでIPSプローブを含有する溶液を用いて、60℃で1、5時間行った。その後6 $\times$ SSC溶液を用いて室温で2回、つづいて60℃で1回濾紙を洗浄した。次いで、この濾紙を乾燥させ、オートラジオグラフィーに供した。その結果、8個のハイブリダイゼーション陽性のコロニーが見いだされた。そこで陽性コロニーから6個をとりあげ、液体培養した後、常法によりコスミドDNAを調製した。得られたDNAをBamHIで切断し、アガロースゲル電気泳動にかけた後、上記IPSプローブを用いたサザンハイブリダイゼーションを行ったところ、すべてのクローンが有する3.2 KbのBamHI断片が該プローブとハイブリダイズしていた。そこで、COS1と命名したクローン由来の該断片をPUC18（宝酒造版）のBamHI部位に常法に従ってサブクロニングし、該断片の制限酵素地図を作製した。これを既に明かとなっているアクレモニウム・クリソゲナム由来のIPNS遺伝子のそれと比較したところ、両者はよく一致していた。さらに、この断片上NcoIからXhoIまでの塩基配列は、Samsonらが報告したIPNS遺伝子のN末端コード領域の配列と完全に一致していた。以上の結果より、COS1のインサート中にIPNS遺伝子が含まれていることが確認された。またCOS1のHindIII、BamHI、SalIによる切断パターンをGutierrezら〔Journal of Bacteriology(1991),173,2354-2365〕によって報告されたアクレモニウム・クリソゲナムのACVS、IPNS遺伝子クラスター領域の制限酵素地図と比較することにより、COS1のインサートはIPNS遺伝子の下流、少なくとも20Kb以上に渡る領域を

カバーしていることが示唆された。

【0028】d.IPNS遺伝子の下流領域のサブクロニングと制限酵素地図の作製；cで得たCOS1をSalIで切断したのち、アガロースゲル電気泳動を行い、サザンの方法により、ゲルからナイロンフィルターにDNAを転写した。該フィルターと32Pで放射能ラベルしたpIPS1の約1KbのPstI-BamHI断片（IPNS遺伝子のC末端コード域から下流へ向かう約1Kbの断片）とのハイブリダイゼーションを行ったところ、約7.3KbのSalI断片がハイブリダイズした。そこで、該断片をpUC18のSalI部位にサブクロニングし、挿入方向を異にする2種のプラスミドpIPD1、pIPD1'を得た。そして、これら2種のプラスミドを制限酵素解析に供し、該SalI断片の部分制限酵素地図を作製した。次ぎに、COS1をEcoRIで切断し、上記と同様にフィルターに転写した。ついで該フィルターと32Pで放射能ラベルしたpIPD1の約0.9KbpのKpnI断片（KpnI<sup>2</sup>部位とベクターのマルチクロニングサイトのKpnI部位での切断で生ずる断片）とのサザンハイブリダイゼーションを行ったところ、約3.9KbのEcoRI断片がハイブリダイズした。そこで、この断片をpUC18のEcoRI部位にサブクロニングし、プラスミドpIPD2を得た。次いで、このプラスミドを用いて該断片の制限酵素地図を作製し、上記SalI断片の地図とオーバーラップさせることにより図3に示すとおり、IPNS遺伝子の下流約10Kbに及ぶ領域の部分制限酵素地図を完成させた。なお、この地図の下段には、上記3種のサブクローンプラスミドpIPS1、pIPD1またはpIPD1'、pIPD2中に含まれるインサートの領域を示した。

【0029】（実施例2）

転写領域の同定

上記pIPD1から数種の制限酵素断片を調製し、それをプローブとしてアクレモニウム・クリソゲナムRNAとのノーザンハイブリダイゼーションを行った。その結果、上記IPNS遺伝子の下流約10Kbに及ぶDNA断片上から、少なくとも2種の未同定RNAが転写されていること、すなわち、該断片上に2種の遺伝子が存在していることが明かとなった。以下、実験の詳細を記述する。

【0030】a.アクレモニウム・クリソゲナムのポリA+RNA抽出；CM固形培地上30℃、3日間生育させたアクレモニウム・クリソゲナムIS-5の菌糸体をN3シード培地50ミリリットルに接種し、25℃で3日間培養した。得られた培養液1ミリリットルをメイン培地30ミリリットルを含む500ミリリットルのフラスコに移植し、25℃で3日間培養した。該菌液10ミリリットルから吸引濾過により集めた菌糸体を液体窒素中で凍結させ、乳鉢と乳棒を用いてすりつぶした。かくして得られた菌破砕粉末からTOTAL RNA ISOLATION KIT（インビトロジェン社）を用いて、その添付プロトコールに従って全RNA800  $\mu$ gを抽出した。次いで、この全RNAからマニアティスの実験書に従って、オリゴ（dT）

11

セルロースクロマトグラフィー操作を行うことによりポリA<sup>+</sup> RNA 27  $\mu$ g を得た。

【0031】b. プローブの調製；上記pIPS1 の約0.4Kb のXhoI-SacI 断片、約0.4KbpのClaI-BamHI断片ならびにpIPD1 の約2.2Kb のPstI断片と、上記実施例1d)で得た約0.9Kb の断片を32Pでラベルして、それぞれプローブA、B、C、Dと称しハイブリダイゼーションに供した。なお、使用したプローブの染色体上における位置は図3に示してある。

【0032】c. ノーザンハイブリダイゼーション；a. で得たポリA<sup>+</sup> RNA 2  $\mu$ g をマニアティスの実験書に記載された方法に従ってグリオキザールにより変性し、1、1%アガロースゲル中で電気泳動したのち、アマーシャム社の添付プロトコルに従ってナイロンフィルター（ハイボンド-N<sup>+</sup>、アマーシャム社）にアルカリ転写した。かくして得たフィルターをb)で調製した4種のプローブとそれぞれハイブリダイゼーションさせた。ハイブリダイゼーションは、50%ホルムアミド、5×SSPE、5×デンハルツ、0.1%SDS、100  $\mu$ g/ミリリットルの変性サケ精子DNA、および終濃度2×10<sup>5</sup> cpm/ミリリットルでプローブA、B、C、Dをそれぞれ含有する溶液中にて42℃で15時間行った。ついで、これらのフィルターを0.1%のSDSを含む2×SSC中、室温で2回づつ洗浄し、さらに、0.1%のSDSを含む0.2×SSC溶液中55℃で30分間したのち、オートラジオグラフィーを行った。その結果、プローブAでは約1.3Kb (IPNS mRNA)、プローブCでは約1.4Kb、そして、プローブDでは約2.1Kbのハイブリダイゼーションバンドが検出された。これに対してプローブBとハイブリダイズするバンドは全く検出されなかった。以上の結果、アクレモニウム・クリソゲナムのIPNS遺伝子から下流約10KbまでのDNA断片上には、少なくとも2種の遺伝子が存在していることが明らかとなった。以後、IPNS遺伝子側に位置し1.4Kbの転写産物を与える遺伝子を $\gamma$ 遺伝子、そして、IPNS遺伝子から遠い方に位置し2.1Kbの転写産物を与える遺伝子を $\alpha$ 遺伝子と称する。

【0033】（実施例3）

$\alpha$  遺伝子の解析

a.  $\alpha$ -cDNA のクローニングとその構造解析；ベクタープライマー (pcDV1 Oligo(d-Tailed Plasmid Primer: フェルマシア社)、リンカー (pL1 Oligo(dG)-Tailed Linker: フェルマシア社) を使用し、上記ポリA<sup>+</sup> RNA 4  $\mu$ g から岡山・バーク法 [Mol. Cell. Biol., 2 161(1982)] に従って、cDNAを組み込んだ組換えプラスミドを作製した。該プラスミドを一部使用して大腸菌 MC1061(ATCC53338)を形質転換し、アンピシリン100  $\mu$ g を含有するL-ブロス寒天培地上（プレート30枚）に約30000個のコロニーを生育させた。次いで、該コロニーをハイボンドN（アマーシャム社）に、アマーシャム社の添付プ

12

ロトコルに従って転写し、DNAを固定した。かくして得たフィルターを実施例2(C)で得たプローブDとハイブリダイゼーションさせた。ハイブリダイゼーションおよびフィルターの洗浄は、実施例2cと同様に行った。その結果、4個のハイブリダイゼーション陽性コロニーが見いだされた。そこで、これらを取り上げ、液体培養したのちプラスミドDNAを調製した。そして、それぞれをpAL1, pAL2, pAL3, pAL4と命名した。これらプラスミドをBam HIで切断し、アガロースゲル電気泳動により解析したところ、pAL3が最も長いcDNAインサートを含むことが判明した。さらに、このサイズ（2.1Kb）はノーザン法により検出された $\alpha$ -mRNAのそれとよく一致していた。そこで、pAL3が有するcDNAインサートの全塩基配列を、サンガーらの方法 [Proc. Nat. Acad. Sci. USA 74 5463(1977)] に基づき決定した。塩基配列決定の具体的実験手技は、タカラのシーケンシングキット（宝酒造販）を用いて、その添付プロトコルに従って行った。かくして決定された2113bpのDNA塩基配列を配列表（配列番号1）に示す。本DNA配列には、116番目に始まるATGから2044番で終わるTAGまで、642個のアミノ酸をコードしうるオープンリーディングフレーム（ORF）が存在していた。該ORFから翻訳したアミノ酸配列を配列表（配列番号1）の塩基配列の下段に示した。

【0034】b.  $\alpha$  遺伝子の構造解析；上記 a. で明らかとなった $\alpha$ -cDNA断片の塩基配列と実施例1で得たIPNS遺伝子下流域の地図とを照合したところ、 $\alpha$  遺伝子はプローブDを含む、図3中のPstI④-EcoRV④間、3.3Kbの断片内に含有されていると推定された。そこで、この断片の全塩基配列をaと同様の実験手技を用いて決定した。なお、決定した塩基配列は配列表（配列番号3：2226番-5537番）に示した。予想どおりこの配列中には、上記cDNA配列から予想されたORFが完全に含まれていた。また、このORFは52bp、63、67、53bpから成る4個のイントロンにより分断されていることが明らかとなった。

【0035】c.  $\alpha$  遺伝子の破壊；図4に示される工程に従って、アクレモニウム・クリソゲナムの $\alpha$  遺伝子を破壊するためのプラスミドpDAL1を構築した。以下に各工程を説明する。まず $\alpha$  遺伝子全体を含有する約6Kbの断片（図3のPstI④-EcoRI⑤までの領域）を所持するプラスミドpALNC1を以下のごとく作製した。pIPD1をPstIで切断したのち約5.6Kbの断片を分離精製し、該断片をT4リガーゼで自己閉環させることによりpALN1を得た。次いで、該プラスミドをEcoRIで切断し、アルカリホスファタスのち約4.9Kbの断片を分離精製した。該断片とpIPD2の約3.9KbのEcoRI断片（実施例1,d)）とを、T4リガーゼで連結することによりpALNC1を得た。次に、このプラスミドから $\alpha$  遺伝子のコード域の約7割を含む1.8KbのEcoRV断片を欠失させ、そこにマーカー遺伝子

13

を挿入することによりpDAL1を作製した。すなわち、pALNC1をEcoRVで切断したのち約6.9Kbの断片を分離精製し、アルカリホスファターゼ処理を施した。一方、pACTHY83をSnaBIとSmaIで二重切断し、ハイグロマイシンBホストトランスフェラーゼ遺伝子発現単位を含有する約3.5Kbの断片を分離精製した。次いで、この両者をT4リガーゼを用いて連結させることによりpDAL1を得た。DraI-SmaIで二重切断した上記pDAL1(10 $\mu$ g)を用いて、参考例1、bの方法に従ってアクレモニウム・クリソゲナムIS-5株の形質転換を行ったところ、二百数十株のHYB形質転換体を得られた。この中からランダムに30株を選択し、参考例1b)と同様に培養して、セファロsporinC生産性を調べて見た。その結果、DAL19, DAL30と命名した2株のセファロsporinC生産性は親株であるIS-5株の20分の1以下にまで低下していることが判明した。また、サルモネラを用いたバイオアッセイ〔Ottら、The Journal of Antibiotics, (1982)35, 637-638〕を試みたところ、該培養液中にはセファロsporinC前駆体の一種であるイソペニシリンNが多量に蓄積していることも明らかとなった。これら2株およびIS-5株から参考例1、cと同様の方法に従って、染色体DNAを抽出し、EcoRIもしくはSalIで切断した。ついで、この切断DNAをアガロースゲル電気泳動したのち、ナイロンフィルターに転写し、放射能ラベルしたpIPD1の約1.8KbのEcoRV断片もしくはpALNC1の約1.8KbのEcoRV断片とのサザンハイブリダイゼーションを行った。その結果、DAL19およびDAL30株では染色体上の $\alpha$ 遺伝子とpDAL1上の破壊された遺伝子とが期待どおり置換していることが判明した。すなわち、DAL19, DAL30株では、pIPD1由来のプロープを用いた場合、EcoRIによる切断で4.1Kbの位置にハイブリダイゼーションシグナルが検出され、親株で観察された位置(3.3Kb)にシグナルは全く認められなかった。また、pALNC1由来のプロープを用いた場合、親株ではSacIによる切断で6.3Kbの位置にハイブリダイゼーションシグナルが明確に認められたが、DAL19およびDAL30株では如何なる位置にもシグナルは検出されなかった(図5)。以上の結果、本発明DNA断片上に存在する $\alpha$ 遺伝子は、セファロsporinC生合成に関与する新規なタンパクをコードしているということが明かとなった。

#### 【0036】(実施例4)

##### $\gamma$ 遺伝子の解析

a.  $\gamma$ -cDNAのクローニングとその構造解析；実施例3、a.で作製したcDNAライブラリー(約30000コロニー)を、実施例2(C)で得たプロープCによるハイブリダイゼーションにてスクリーニングしたところ、3個の陽性コロニーが見いだされた。実施例3、a.と同様に、これらのコロニーよりプラスミドを調製、解析した結果、pGAN2と命名したプラスミドが最長のcDNAインサートを含

14

トのサイズ(約1.4Kb)は、ノーザン解析により検出された $\gamma$ -mRNAのそれとよく一致していた。そこで、pGAN2が保有するcDNAインサートの全塩基配列を実施例4と同様の実験手技を用いて決定した。かくして得られた1462bpの塩基配列を配列表(配列番号2)に示す。本DNA配列には、52番目に始まるATGから1203番で終わるTAGまで、383個のアミノ酸をコードするORFが存在していた。該ORFより翻訳したアミノ酸配列を配列表(配列番号2)の塩基配列の下段に示した。

【0037】b.  $\gamma$ 遺伝子の構造解析；上記a.で明らかとなった $\gamma$ -cDNAの塩基配列と実施例1で得たIPNS遺伝子下流域の地図とを照合したところ、 $\gamma$ 遺伝子は実施例2において使用したプロープC、すなわち、図3中のPstI③-PstI④間、2.1Kbの断片内に含有されていると推定された。そこで、この断片の全塩基配列を決定した。かくして得られた配列を配列表(配列番号3：1番-2231番)に示した。予想どおりこの配列中に、上記cDNA配列から予想されたORFが完全に含まれていた。また、 $\gamma$ 遺伝子は94bpからなる少なくとも1個のイントロンを所有しており、上記 $\alpha$ 遺伝子とは逆方向に転写されることなどが明かとなった。

【0038】c.  $\gamma$ 遺伝子の破壊；第6図に示される工程に従って、アクレモニウム・クリソゲナムの $\gamma$ 遺伝子を破壊するためのプラスミドpDNS1を構築した。まずpIPD1'をNcoIとStuIで切断した後、約9Kbの断片を分離精製し、該断片の両末端をDNAポリメラーゼクレノウ断片と4種のデオキシヌクレオシド5'-3リン酸を用いて平滑化した。次いで、この断片と実施例3、c)で得たpACTHY83由来の約3.5KbのSnaBI-SmaI断片とを、T4リガーゼを用いて連結させることによりpDNS1を得た。SmaIで切断したpDNS1(10 $\mu$ g)を用いて、参考例1、b)の方法に従ってアクレモニウム・クリソゲナムIS-5株の形質転換を行ったところ、二百数十株のHYB形質転換体を得られた。この中から10株をランダムに選択し、参考例1、bと同様に培養して、セファロsporinC生産性を調べてみた。その結果、DNS1, DNS5と命名した2株のセファロsporinC生産性は、親株であるIS-5株の10分の1以下にまで低下していることが判明した。また、驚くべきことに、これらの株も上記 $\alpha$ 破壊株と同様に、多量のイソペニシリンNを蓄積していることが明かとなった。これら2株およびIS-5株から参考例1、cと同様の方法に従って、染色体DNAを抽出し、EcoRIもしくはSalIで切断した。これらDNA切断物をアガロースゲル電気泳動した後、ナイロンフィルターに転写し、サザンハイブリダイゼーションを行った。プロープは、EcoRI切断の場合はpIPD1の約0.35KbのEcoRI断片、そして、SalI切断の場合はpIPD1の約1.8KbのEcoRV断片をそれぞれ放射能ラベルして使用した。その結果、DNS1およびDNS5株では染色体上のNcoI①-StuI①断



15

片がハイグロマイシンBホストトランスフェラーゼ遺伝子発現単位と期待どおり置換していることが判明した。すなわち、DNS1およびDNS5株では、EcoRI による切断で4,9Kb、SalIによる切断で3,9Kbの断片がそれぞれのプローブとハイブリダイズし、親株で観察された位置(EcoRI:3,3Kb, SalI:7,3Kb)にハイブリダイゼーションシグナルは全く認められなかった(図7)。

【0039】以上の結果、本発明DNA断片上に存在する $\gamma$ 遺伝子は、先述の $\alpha$ 遺伝子と同様に、セファロスポリンC生合成に関与する新規なタンパクをコードしているということが明かとなった。さらに、これら遺伝子欠損株において蓄積する中間代謝物の解析結果から、両遺伝子はいずれもイソペニシリンNエピメラーゼ活性発現に関与していることも明かとなった。先述の参考例および実施例において制限酵素消化により生ずるDNA断片の分離は、すべて1%アガロースゲル電気泳動により行い、アガロースゲルからのDNA断片の単離精製は、ジーンクリーン(GENE CLEAN, フナコシ社販)を用いて、その添付プロトコールに従って行った。また特に断わらない限り、DNA断片の放射能ラベル化は、マルチプライムDNAラベリングシステム(Multiprime DNA labeling system: Amersham)を用いて、それに付属するプロトコールに従って行った。また、DNA断片の結合反応、該反応により生ずるプラスミドを用いた大腸菌の形質転換、得られた形質転換体からのプラスミドの調製\*

## 配列

```

ACTTACACCC TTCTCCGAGA CAGTCAAAGC CACCAGCACC AGCACCAATG TCTCGAGGGC 60
AAGGACATCG CTCGCAAAGA CACAAGCACA CACGGGAGCA TAACGGCAAT CCCC A TG 118
Met
1
GCA CCC GGC GGC CTA CTA ACC CTC GCT GGC GCC GCT GCC GCC AGC ACC 166
Ala Pro Gly Gly Leu Leu Thr Leu Ala Gly Ala Ala Ala Ala Ser Thr
5 10 15
GCC GCC GCT GCC TAC CTC GAC GCC AAG CTT CAC CTC ACC AAG GAC CTC 214
Ala Ala Ala Ala Tyr Leu Asp Ala Lys Leu His Leu Thr Lys Asp Leu
20 25 30
AAC CAG CTC GCC CGC GCC GAA CGG GGG GCC CAG AAC TTC GCC AGA GCT 262
Asn Gln Leu Ala Arg Ala Glu Arg Gly Ala Gln Asn Phe Ala Arg Ala
35 40 45
GTT GAG CAG CGC AAG GCA TCT GGC TTC TTC CTC TTC GAG GCC GCC GCT 310
Val Glu Gln Arg Lys Ala Ser Gly Phe Phe Leu Phe Glu Ala Ala Ala
50 55 60 65
GCC CGC CTC GGC GAT GCA CCT TGC ATC TGG TGG GGC GGC CAC CCC GAG 358
Ala Arg Leu Gly Asp Ala Pro Cys Ile Trp Ser Arg Gly His Pro Glu
70 75 80
TAC TCG TGG ACG CAG ACG TAC CAA CGC GCA TGT CAG TAT GGC CAC TAC 406
Tyr Ser Trp Thr Gln Thr Tyr Gln Arg Ala Cys Gln Tyr Gly His Tyr
85 90 95
TTC CGC GAT CTG GGC GTG GTG GCC GGG CAG CAC GTC GGT GTT TAT CTG 454
Phe Arg Asp Leu Gly Val Val Ala Gly Gln His Val Gly Val Tyr Leu

```

16

\* よびその解析等の基本操作は、すべてマニアテスの実験書に記載された方法に準じて行った。

## 【0040】

【発明の効果】実施例に開示したとおり、本発明のDNA断片上には、アクレモニウム・クリソゲナムにおけるセファロスポリンC生合成に関与する新規遺伝子が少なくとも2個存在している。したがって、該断片あるいは、該遺伝子に対応するcDNA化合物を使用することにより、セファロスポリンC発酵能が向上したアクレモニウム・クリソゲナム株の創製が期待できる。

## 【配列表】

【0041】配列番号：1

配列の長さ：2113

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

起源

生物名：アクレモニウム クリソゲナム (Acremonium chrysogenum)

株名：IS5

配列の特徴

特徴を表わす記号：CDS

存在位置：116..2044

特徴を決定した方法：P

1 7																
100				105				110								
TAC	AAC	TCG	CCG	GAG	CTG	ATG	TTC	ATC	TGG	ATG	GGT	CTA	CTG	TCT	ATC	502
Tyr	Asn	Ser	Pro	Glu	Leu	Met	Phe	Ile	Trp	Met	Gly	Leu	Leu	Ser	Ile	
115				120				125								
GGT	GCT	GCT	CCT	GCC	CTC	ATC	AAT	TAC	AAT	CTC	GGC	TCT	GAT	GCT	CTG	550
Gly	Ala	Ala	Pro	Ala	Leu	Ile	Asn	Tyr	Asn	Leu	Gly	Ser	Asp	Ala	Leu	
130				135				140				145				
GTT	CAC	TGT	GTC	CGC	TTG	TCG	CGC	TCG	CGG	TTT	CTG	ATA	TAC	GAT	GAT	598
Val	His	Cys	Val	Arg	Leu	Ser	Arg	Ser	Arg	Phe	Leu	Ile	Tyr	Asp	Asp	
150				155				160								
GCG	TCC	GAT	TGT	TCC	TCT	CGC	ATT	CAC	GAA	GTT	GGT	GAG	CGG	CTT	CGG	646
Ala	Ser	Asp	Cys	Ser	Ser	Arg	Ile	His	Glu	Val	Gly	Glu	Arg	Leu	Arg	
165				170				175								
GAT	ATC	AAT	GTC	GAG	GCT	ATC	ATG	CTC	TCC	GGC	ACG	CTG	AAG	GAA	GAC	694
Asp	Ile	Asn	Val	Glu	Ala	Ile	Met	Leu	Ser	Gly	Thr	Leu	Lys	Glu	Asp	
180				185				190								
ATT	GCC	CGG	AAA	GAA	ACA	CAC	AGG	GCA	CCG	GTA	GAT	TGC	TTC	GAG	GAC	742
Ile	Ala	Arg	Lys	Glu	Thr	His	Arg	Ala	Pro	Val	Asp	Cys	Phe	Glu	Asp	
195				200				205								
ACC	AAG	GTG	CTG	CTA	CCG	TTT	GCT	TTG	ATG	TAC	ACT	AGT	GGT	ACG	ACT	790
Thr	Lys	Val	Leu	Leu	Pro	Phe	Ala	Leu	Met	Tyr	Thr	Ser	Gly	Thr	Thr	
210				215				220				225				
GGC	CTG	CCA	AAG	GCC	GCA	CCC	ATC	ACA	GTG	GCC	AGG	AAC	TAT	CCC	TCT	838
Gly	Leu	Pro	Lys	Ala	Ala	Pro	Ile	Thr	Val	Ala	Arg	Asn	Tyr	Pro	Ser	
230				235				240								
GCT	TCA	CTG	CTG	CCA	AAG	ACA	TTT	GGG	CAG	AAA	CCG	GGC	CCC	AAC	GGT	886
Ala	Ser	Leu	Leu	Pro	Lys	Thr	Phe	Gly	Gln	Lys	Pro	Gly	Pro	Asn	Gly	
245				250				255								
GAC	CGC	ACC	TAC	TAC	TGC	ATC	CCG	CTC	TAC	CAC	GGA	ACG	GGG	GGC	ATC	934
Asp	Arg	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Ile	Pro	Leu	Tyr	His	Gly	Thr	Gly	Gly	Ile	
260				265				270								
GCG	GCC	ATG	AAC	GAC	TTG	ATG	AGC	GGA	ATA	TCC	ATT	GCT	CTT	GCG	CCC	982
Ala	Ala	Met	Asn	Asp	Leu	Met	Ser	Gly	Ile	Ser	Ile	Ala	Leu	Ala	Pro	
275				280				285								
AAG	TTC	TCC	TTG	TCT	CGC	TTC	TGG	GAC	GAT	TGC	ATA	GAG	AGC	GGG	TCA	1030
Lys	Phe	Ser	Leu	Ser	Arg	Phe	Trp	Asp	Asp	Cys	Ile	Glu	Ser	Gly	Ser	
290				295				300				305				
ACA	ATA	TTT	GTC	TAT	GTC	GGG	GAA	CTT	ATT	CGG	TAC	CTA	CTC	TCT	GCT	1078
Thr	Ile	Phe	Val	Tyr	Val	Gly	Glu	Leu	Ile	Arg	Tyr	Leu	Leu	Ser	Ala	
310				315				320								
CCG	GCC	TCA	CCA	AAG	GAC	CGT	CAG	CAC	CGC	GTC	CGT	CTC	GTC	TGG	GGG	1126
Pro	Ala	Ser	Pro	Lys	Asp	Arg	Gln	His	Arg	Val	Arg	Leu	Val	Trp	Gly	
325				330				335								
AAC	GGA	CTC	AGC													

19

Leu Leu Lys His Tyr Arg Gly Gly Gly Phe Gly Leu Gly Ala Val Gly	
370	375 380 385
CAC CAC GGT TGG CTC CTC CGC CGC AAG TTT CAC AAT GAC TAC GTA CCC	1318
His His Gly Trp Leu Leu Arg Arg Lys Phe His Asn Asp Tyr Val Pro	
390 395 400	
GTC AGG ATC GAC CCG GAG ACG GGT GAC ATC TGG CGG TCG CCG AAG ACG	1366
Val Arg Ile Asp Pro Glu Thr Gly Asp Ile Trp Arg Ser Pro Lys Thr	
405 410 415	
GGC TTT GCC GAG CGA CTG CCG TAC GAG AGG GGC GGT GAG ATC CTG GCG	1414
Gly Phe Ala Glu Arg Leu Pro Tyr Glu Arg Gly Gly Glu Ile Leu Ala	
420 425 430	
CGG CTC CCG TCA CGG TCA GCC TGG GCT GGG TAC TGG CAT GCT GAG GAG	1462
Arg Leu Pro Ser Arg Ser Ala Trp Ala Gly Tyr Trp His Ala Glu Glu	
435 440 445	
GCG ACG CAG AAG AAG CTG GTG GAG AAT GTG TTT GAG AAG GGG GAT CTG	1510
Ala Thr Gln Lys Lys Leu Val Glu Asn Val Phe Glu Lys Gly Asp Leu	
450 455 460 465	
TAC TTC CCG ACG GGT GAT GCT CTT CGA CGC GAT GCC GAC GGT CAC TGG	1558
Tyr Phe Arg Thr Gly Asp Ala Leu Arg Arg Asp Ala Asp Gly His Trp	
470 475 480	
TAC TTT CTC GAC CGA CTT GGC GAC ACA TAC CGC TGG AAA GGA GAA AAC	1606
Tyr Phe Leu Asp Arg Leu Gly Asp Thr Tyr Arg Trp Lys Gly Glu Asn	
485 490 495	
GTG TCC ACG ACC GAG GTA GGA CAA GTC CTG GGC TCA CAC GCA GAC ATT	1654
Val Ser Thr Thr Glu Val Gly Gln Val Leu Gly Ser His Ala Asp Ile	
500 505 510	
GCC GAG GCC AAT GTC TAC GGC GTC CAG GTC CCC AAC CAC GAC GGG CGA	1702
Ala Glu Ala Asn Val Tyr Gly Val Gln Val Pro Asn His Asp Gly Arg	
515 520 525	
GCC GGC TGC GCA GCC ATC GCA TTG AAG AAC GCG GCA ACC CCA GAC ACG	1750
Ala Gly Cys Ala Ala Ile Ala Leu Lys Asn Ala Ala Thr Pro Asp Thr	
530 535 540 545	
TTG GAC TGG TCA CGG CTG ACG TCG CTC CTG CGG TCA GAG TTG CCC TCC	1798
Leu Asp Trp Ser Arg Leu Thr Ser Leu Leu Arg Ser Glu Leu Pro Ser	
550 555 560	
TAC GCC GTT CCT GTC TTC ATT AGG GTG CGG GAG ACG GTG GGA GGC ATG	1846
Tyr Ala Val Pro Val Phe Ile Arg Val Arg Glu Thr Val Gly Gly Met	
565 570 575	
AGC ACG GAT AAC CAT AAA CAC AAC AAG GTG CCA CTC CGC GAC GAG GGG	1894
Ser Thr Asp Asn His Lys His Asn Lys Val Pro Leu Arg Asp Glu Gly	
580 585 590	
GTC GAC CCG CGC TCC ATG GGC AGC AAG GTC CCT GGA GGT GAA AAG GAT	1942
Val Asp Pro Arg Ser Met Gly Ser Lys Val Pro Gly Gly Glu Lys Asp	
595 600 605	
CGC TTC TTC TGG CTG CCG GCC GGT GCG AGC AAG TAT GTT CCC TTT ACC	1990
Arg Phe Phe Trp Leu Pro Ala Gly Ala Ser Lys Tyr Val Pro Phe Thr	
610 615 620 625	
GAG CGG GAC TGG GAT CTA CTG TCC GGC CAG TCG GCG GCT CGG CCA AGA	2038
Glu Arg Asp Trp Asp Leu Leu Ser Gly Gln Ser Ala Ala Arg Pro Arg	
630 635 640	

(12)

特開平6-38763

21

22

CTC TAGTTGCTAT TAACGGGACC CATCGACGCG TGAAACGATG TAACATAGAA

2091

Leu

AACAAATGTG GCTTGCAAAA CA

2113

【0042】配列番号: 2

\*生物名: アクレモニウム クリソゲ ナム(Acremonium chrysogenum)

配列の長さ: 1462

株名: IS5

配列の型: 核酸

配列の特徴

鎖の数: 二本鎖

特徴を表す記号: CDS

トポロジー: 直鎖状

存在位置: 52..1203

配列の種類: cDNA to mRNA

\*10 特徴を決定した方法: P

起源

配列

CCGACATTAC ATGTTGTAGT CTTGACCATT CACGCGGTTA ATCCACCTC G ATG GAC 57

Met Asp

1

CCC TCT CGC CCA CAT CCG CTA TCC GGC AAG CTT GTC GTA GAG CTC GCG 105

Pro Ser Arg Pro His Pro Leu Ser Gly Lys Leu Val Val Glu Leu Ala

5

10

15

GGG CTA GCC CCA GGC CCA TTC TGT GGC ATG CTC TTG GCA GAC TAT GGC 153

Gly Leu Ala Pro Gly Pro Phe Cys Gly Met Leu Leu Ala Asp Tyr Gly

20

25

30

GCC TCA GTA CTC CGC ATC GAC GGA CCG CGA TCC CCA AAG GGC GAC GTC 201

Ala Ser Val Leu Arg Ile Asp Gly Pro Arg Ser Pro Lys Gly Asp Val

35

40

45

50

CTG GCG AGG AAC AAG TCG TCC ATC TGC ATC GAC TTG AAG CAT CCG CCC 249

Leu Ala Arg Asn Lys Ser Ser Ile Cys Ile Asp Leu Lys His Pro Pro

55

60

65

TCA CGC AAG GTG CTC CTC TCC ATC CTG TCC CGC GCG GAC GTG CTC ATC 297

Ser Arg Lys Val Leu Leu Ser Ile Leu Ser Arg Ala Asp Val Leu Ile

70

75

80

GAC CCG TTC CGG CCC GGC GTC CTG GAG CGT CTG GGG CTC TCC CCC ACA 345

Asp Pro Phe Arg Pro Gly Val Leu Glu Arg Leu Gly Leu Ser Pro Thr

85

90

95

GAG GTC CTT CTC AAG GCG AAT GCC CGC CTG GTG GTC GCC CGT CTC ACC 393

Glu Val Leu Leu Lys Ala Asn Ala Arg Leu Val Val Ala Arg Leu Thr

100

105

110

GGC TTC CGC CGA GAT GGC AAG TAC CAG GAC ATG GCA GGC CAT GAT ATC 441

Gly Phe Arg Arg Asp Gly Lys Tyr Gln Asp Met Ala Gly His Asp Ile

115

120

125

130

AAC TAC CTC GCC GTG TCT GGC GTC CTG GCT ATG CTT GGT AGG GCA GGC 489

Asn Tyr Leu Ala Val Ser Gly Val Leu Ala Met Leu Gly Arg Ala Gly

135

140

145

GAG AAT CCC TTC CCG CCG GCC AAC ATC CTC GGC GAC TTT GCC GGA GGC 537

Glu Asn Pro Phe Pro Pro Ala Asn Ile Leu Gly Asp Phe Ala Gly Gly

150

155

160

GGC GCC ATG TGC GTC GTG GGA ATT CTG CTG GCG CTC GTA TCG CGC GAT 585

Gly Ala Met Cys Val Val Gly Ile Leu Leu Ala Leu Val Ser Arg Asp

165

170

175

GCC ACG GGC CTT GGC CAG GTC GTC GAG GCC AAC ATG GTG GAC GGC TCT 633

Ala Thr Gly Leu Gly Gln Val Val Glu Ala Asn Met Val Asp Gly Ser

180

185

190

aminoacids  
126-134

23	24
GCG TAC CTG GCC ACG ATG CCG CGC CTG GCG ACC AAG ACG CCC TTC TGG	681
Ala Tyr Leu Ala Thr Met Pro Arg Leu Ala Thr Lys Thr Pro Phe Trp	
195 200 205 210	
GGT TCC CCG CGG GGC GAG AAT GTC CTG GAC GGA GGG TGC CCC TGG TAT	729
Gly Ser Pro Arg Gly Glu Asn Val Leu Asp Gly Gly Cys Pro Trp Tyr	
215 220 225	
GCG ACA TAC CGG ACA AAG GAC CCC GGC GGG AAG TAC ATG GCC GTG GGA	777
Ala Thr Tyr Arg Thr Lys Asp Pro Gly Gly Lys Tyr Met Ala Val Gly	
230 235 240	
GCG CTG GAG CCT CAC TTC TAC GAG GTG CTG GTG CGA GGT CTG GGC CTG	825
Ala Leu Glu Pro His Phe Tyr Glu Val Leu Val Arg Gly Leu Gly Leu	
245 250 255	
GAC AAG ACG GAC CTG CCT CCG CGG GAG GAT AGG GCC AAT TGG CCG AGA	873
Asp Lys Thr Asp Leu Pro Pro Arg Glu Asp Arg Ala Asn Trp Pro Arg	
260 265 270	
CTG AGG GCG CTA TTC GAG GCA AAA TTT GCG GAG AGG ACG CGC AGC GAG	921
Leu Arg Ala Leu Phe Glu Ala Lys Phe Ala Glu Arg Thr Arg Ser Glu	
275 280 285 290	
TGG GCG GAG GTC TTT GAC GGG ACG GAT GCC TGC GTC ACC CCG GTC CTG	969
Trp Ala Glu Val Phe Asp Gly Thr Asp Ala Cys Val Thr Pro Val Leu	
295 300 305	
GAG CAA GGT GAG CTG GAG AAG GCC GGC TTC GAA CAA CGG CTT CCC GTG	1017
Glu Gln Gly Glu Leu Glu Lys Ala Gly Phe Glu Gln Arg Leu Pro Val	
310 315 320	
AAT TTG GGG GCC ACG CCG GGA AAG CCT ATT CTT CCC GGA CAG GGT GAT	1065
Asn Leu Gly Ala Thr Pro Gly Lys Pro Ile Leu Pro Gly Gln Gly Asp	
325 330 335	
TGG ACG GGC GGG ACC CTT GCC AAG GGC CAT GGA GGA GAG GAG ATC CTG	1113
Trp Thr Gly Gly Thr Leu Ala Lys Gly His Gly Gly Glu Glu Ile Leu	
340 345 350	
CGC CGG TGG ATT GGG TGG GAA AGG GGG GTT GAC TAC CAC GTT GAG GAG	1161
Arg Arg Trp Ile Gly Trp Glu Arg Gly Val Asp Tyr His Val Glu Glu	
355 360 365 370	
AAT AGC GGA ATT CTC GTC GCT TGT TCG CGG GAA AAG TTG TAGGCAGGCA	1210
Asn Ser Gly Ile Leu Val Ala Cys Ser Arg Glu Lys Leu	
375 380	
GGCAGGCCAT GCTGGTACAT GCATGCAATG TTGGCCGCTT ATGTACGTAT GTGCATACAT	1270
AAACATTGAC AATAGTGGTG TCATGAAGGA GGAGGGGGG GGTGGGTTTC GGCCCTGAC	1330
GGTGGCTTGA TCGGGACATG GACGCCGCAT CGTCAGCGGA GTCAAGCCTC CGACAGACC	1390
TGCCGACCCG ACATCCGAGT ATCTGTACGT AAGATTGCAT ACCAACAATG TACACCTACT	1450
TCCTACGGTT CC	1462

【0043】配列番号：3

配列の長さ：5537

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

起源

生物名：アクレモニウム クリソゲ ナム (Acremonium \*

配列

\* chrysogenum)

株名：IS5

配列の特徴

特徴を表す記号：intron

存在位置：1613..1520 3860..3911 4178..4240 435

7..4423 4839..4891

特徴を決定した方法：E

25

CTGCAGTAAT TACGCCTTGT ATTATCTCAG TGCACAGCA GCATGGTTGA GAGTCCCCAA	60
CGAGGATGAA GACGGTGAAA AGGGAGGTG CATCCCAAGG CTGTGAATTC CAACACAGGC	120
AGCACGATTT TTCTTTTTC ATTTGCTCC ATGCAACCTC CAGAGAGAAA ATCCTGGAAC	180
CGTAGGAAGT AGGTGTACAT TGTGGTATG CAATCTAAG TACAGATACT CGGATGTCGG	240
GTCGGCAGGT CTGTCGGGAG GCTTGACTCC GCTGACGATG CGCGTCCAT GTCCCGATCA	300
AGCCACCGTC AGGGGCCGAA ACCCACCCTC CCTCCTCC TTCATGACAC CACTATTGTC	360
AATGTTTATG TATGCACATA CGTACATAAG CGGCAACAT TGCATGCATG TACCAGCATG	420
GCCTGCCTGC CTGCCTACAA CTTTCCCGC GAACAAGCGA CGAGAATTCC GCTATTCTCC	480
TCAACGTGGT AGTCAACCCC CTTTCCAC CCAATCCACC GGCGCAGGAT CTCCTCTCCT	540
CCATGGCCCT TGGCAAGGGT CCGCCCGTC CAATCACCCT GTCCGGGAAG AATAGGCTTT	600
CCCGCGTGG CCCCCAATT CACGGGAAGC CGTTGTTCA AGCCGGCCTT CTCCAGCTCA	660
CCTTGCTCCA GGACCGGGT GACGAGGCA TCCGTCCCGT CAAAGACCTC CGCCACTCG	720
CTGCGCTCC TCTCCGAAA TTTGCTCG AATAGCGCC TCAGTCTCG CCAATTGGCC	780
CTATCCTCCC GCGGAGGCG GTCCGTCTTG TCCAGGCCA GACCTCGAC CAGCACCTCG	840
TAGAAGTGAG GCTCCAGCG TCCACGGCC ATGACTTCC CGCCGGGTC CTTGTCCGG	900
TATGTGCGAT ACCAGGGGCA CCCTCCGTCC AGGACATTCT GCGCCGGG GGAACCCAG	960
AAGGGCGTCT TGGTCGCCAG GCGCGCATC GTGGCAGGT ACGCAGACC GTCCACCATG	1020
TTGGCCTCGA CGACCTGGCC AAGCCCGTG GCATCGCG ATACGAGCG CAGCAGAATT	1080
CCCAACGAGC ACATGGGCC CCCTCCGCA AAGTCGCGA GGATGTTGGC CGCGGGAAG	1140
GGATTCTGCG CTGCCCTACC AAGCATAGCC AGGACGCCAG ACACGGCGAG GTAGTTGATA	1200
TCATGGCCTG CCATGTCTG GTACTTGCCA TCTCGCGA AGCCGGTGAG ACGGGCGACC	1260
ACCAGGCGG CATTCGCCTT GAGAAGGACC TCTGTGGGG AGAGCCCAG ACGTCCAGG	1320
ACGCGGGCC GGAACGGTC GATGAGCAG TCCGCGGG ACAGGATGGA GAGGAGCACC	1380
TTGCGTGAG GCGGATGCTT CAAGTCGATG CAGATGGAG ACTTGTTCCT CGCCAGGAG	1440
TCCCTTTTG GGGATCGCG TCGTCGATG CGGAGTACT AGGCGCCATA GTCTGCAAG	1500
AGCATGCCAC AGAATGGCC TGGAGTGGC GAGTTAGTC GTGAGCGAA GAAGCGGCTT	1560
CTATGCGTAG GCCTCTCGG AGAGCAACAT GAAAGTGGT ATGGATGAG GACCTGGGG	1620
TAGCCCGCG AGCTCTACG CAAGCTTGGC GGATAGCGA TGTGGCGAG AGGGGTCCAT	1680
CGAGGTGGG TTAACCGGT GAATGGTCAA GACTACAACA TGTAATGTCG GCAGGTGGT	1740
AGCGGAAATC CCACCATGCC ATTTGATGTT ATTTAGTCC GACTTGCAA TCTCGAAGCC	1800
TGCCTCGCA TGGATGGTG AGCGTGGTA GGTGGCATT GCGTAATTTC TACCCAGTG	1860
TACAGAAGC TCGGGTCCG TACCGCGAG CGACTATGA AACATGGTG GATATCAAAA	1920
GCGCATCGG GACGTTAAG ATTCTGTCT CGGCATGTAC TCTGCTGAG TATCAAGGC	1980
GGAGCCTGTG CATCGAAGT GAAATCTAG CTGCACCAAG GACGGGGGC ATGCCAGTGT	2040
CCAAGAATAG ACTCATGTC TCCATCCTC CATCATGAAT GAAACCTGCC CAGTTGGGCA	2100
AGCAGGTTGT TGCCAAGTAA TAACCTCAGA CATAATTCAT AGTCATCCAG AGCACAGACT	2160
ACGATACAC GACCTCATTA TGGCATGGCA TGTATGAGA CTGTGCGCT AAATCAGGCA	2220
TCATTCTGCA GTACAAATGT TGCTCCGAT GGTCCGTGC TTGTATTACT TGGCGGAGCA	2280
TGTAATGTAA TATACCCCC CTGTCATGTA CGGAGAAAG CAAGTATCAA TGTAATGTT	2340
GTGCAAGGTG GGTGTACATT ATAGGCGTC CTGTGGCAG ACAGATGTAC ATGTACAACT	2400
TACATAGTCA CGGTACTTG CTATATTAAG ACGAGGGGG CCGGCCCGCT CGATCCAGTC	2460
AAGGCACAGC ATCTGATTC ATCCAGACCA ATGCTTAGTA CATGTAACCT TAACCACTAG	2520
CTCTTAAGCT GTAAGCACT CTGCCCGCG AGCCGACCG CCTCACCCC CTGTCCGGCT	2580
GTTGTACCGT ACGAAGGGAT GAGTTGGCCA CGGTGTTCC ACCACGTAGC CTATGCGTAC	2640
AGTATGCGCT GCTTGGCGTC GGTCTGGGC AGTGAATATC ATCCCGTAGC CAAGAGTCAG	2700
CGTATTACTG TCCATGTTCT TTTACGTAAG GTACAATGTT TGTATGTAGT CGAGACTATA	2760
ACCTGGACAC GCATGGCCG GGCATATCC GACAGGAACA GTCTTGAAT CTTAGTGCC	2820
TGGTTCACG GCGCCGTAC AGTACCGTAC GGAGTCCGGA CGTACGGACA CCTCTGTTA	2880
GTGCGGCCG AACATCGCG CCGATCTCCC TCCATCCATG TCCCTTGGCC CCTCCAAA	2940
AGGGCCAAA CCCACAGACC CGCCACCA TCAGGTCTCC CAAGCTTCTG GGTGCGGAG	3000

27	28
CTAGCAGTCT TCAACAACTA TTCGTCAATA CTGGTTGTGT CCGTGTTTGG TCAACTTTTG	3060
GACTCCCGAT CGCAGGATCA CTTACACCCT TCTCCGAGAC AGTCAAAGCC ACCAGCACCA	3120
GCACCAATGT CTCGGAGGCA AGGACATCGC TCGCAAAGAC ACAAGCACAC ACGGGAGCAT	3180
AACGGCAATC CCCAATGGCA CCGGCGGCC TACTAACCTT CGCTGGCGCC GCTGCCGCCA	3240
GCACCGCCGC CGCTGCCTAC CTGACGCCA AGCTTACCT CACCAAGGAC CTCAACCAGC	3300
TGCCCCGCGC CGAACGGGG GCGCAGAACT TCGCCAGAGC TGTGAGCAG CGCAAGGCAT	3360
CTGGCTTCTT CCTCTTCGAG GCGCCGCTG CCGCCTCGG CGATGCACCT TGCATCTGGT	3420
CGCGCGGGCA CCCCGAGTAC TCGTGGACGC AGACGTACCA ACGCGCATGT CAGTATGGCC	3480
ACTACTTCGG CGATCTGGGC GTGGTGGCCG GGCAGCACGT CGGTGTTTAT CTGTACAAT	3540
CGCCGGAGCT GATGTTATC TGGATGGGTC TACTGTCTAT CGGTGCTGCT CCTGCCCTCA	3600
TCAATTACAA TCTCGGCTCT GATGCTCTGG TTAAGTGTGT CCGCTTGTG CGCTCGGGT	3660
TTCTGATATA CGATGATGCG TCGATTGTT CCTCTCGCAT TCACGAAGTT GGTGAGCGC	3720
TTCCGGGATAT CAATGTCGAG GCTATCATGC TCTCCGGCAC GCTGAAGGAA GACATTGCCC	3780
GGAAAGAAAC ACACAGGGCA CCGGTAGATT GCTTCGAGGA CACCAAGGTG CTGCTACCGT	3840
TTGCTTTGAT GTACACTAGG TGAGTAAAGC CTCGGACTTC ACCCACCAGT TGCACATTCT	3900
CACGGCAAAA GTGGTACGAC TGGCCTGCCA AAGGCCGCAC CCATCACAGT GGCCAGGAAC	3960
TATCCCTCTG CTTCACTGCT GCCAAAGACA TTTGGGCAGA AACCGGGCCC CAACGGTGAC	4020
CGCACCTACT ACTGCATCCC GCTTACCAC GGAACGGGG GCATCGCGC CATGAAGAC	4080
TTGATGAGCG GAATATCCAT TGCTCTTGGC CCCAAGTTCT CCTTGTCTCG CTTCTGGGAC	4140
GATTGCATAG AGAGCGGGTC AACAAATTT GTCTATGGTA AGCCACTACT CTCCTTGGT	4200
ACCCCTCTTC GACTTGTGTT CCCTCTGAC GAGTGTACAG TCGGGGAAT TATTCGGTAC	4260
CTACTCTCTG CTCGGGCTC ACCAAAGGAC CGTCAGCACC GCGTCCGTCT CGTCTGGGG	4320
AACGGACTCA GCCCGGAAT CTGGACCAAA TTCCAGGTAT GATCCCCCTT TACTTCGGT	4380
CAGCCCCATC GAAACCATAG GATTGACACC AAGGACAAA CAGGACCGCT TCGCGTATC	4440
GGACATCGGT GAATTTCTAG CCAGCACAGA AGGCGTCTG AACTCTTAA AACACTACCG	4500
CGGCGGTGGT TTCGGCTCG GCGCGTGGC CCACCACGGT TGGCTCTCC GCCGAAGTT	4560
TCACAATGAC TACGTACCG TCAGGATCGA CCCGGAGACG GGTGACATCT GCGGTGCGC	4620
GAAGACGGGC TTTGCCGAGC GACTGCCGTA CGAGAGGGGC GGTGAGATCC TGGCGGGCT	4680
CCCGTCACGG TCAGCCTGGG CTGGTACTG GCATGCTGAG GAGGCGACG AGAAGAAGCT	4740
GGTGAGAAAT GTGTTGAGA AGGGGATCT GTACTTCCG ACGGGTGTG CTCTTCGACG	4800
CGATGCGAC GGTCACTGGT ACTTTCTCGA CCGACTTGGT ACGTTATCCC TGCTACAATC	4860
GCAGAGTGAC AATGCTAAAC GTGAATACCA GCGACACAT ACGCTGGAA AGGAGAAAAC	4920
GTGTCCACGA CCGAGGTAGG ACAAGTCTG GGCTCACAG CAGACATTGC CGAGGCCAAT	4980
GTCTACGGCG TCCAGGTCCC CAACACGAC GGGCGAGCG GCTGCGCAGC CATCGCATG	5040
AAGAACGCGG CAACCCAGA CAGTTGGAC TGGTCAAGC TGACGTCGT CCTGCGGTCA	5100
GAGTTGCCCT CCTACGCCGT TCCTGTCTT ATTAGGGTGC GGGAGACGGT GGGAGGCATG	5160
AGCACGGATA ACCATAAACA CAACAAGGTG CCACTCCGG ACGAGGGGT CGACCCGCGC	5220
TCCATGGGCA GCAAGGTCCC TGGAGGTGAA AAGGATCGCT TCTTCTGGCT GCCGGCGGT	5280
GCGAGCAAGT ATGTTCCCTT TACCGAGCG GACTGGGATC TACTGTCCG CCAGTCGGCG	5340
GCTCGGCCAA GACTCTAGTT GCTATTAACG GGACCCATCG ACGCGTGAAA CGATGAACA	5400
TAGAAAACAA ATGTGGCTTG CAAAACACAT GTAATTCGCG ATAAAGCTG AAGAGCGTAA	5460
ACACAACATA GAGGGCAGAT TCGGCCGAAC TCAACCGCT ATGACTCCGT AACGCGGGA	5520
ACAACCACTC AGATATC	5537

## 【図面の簡単な説明】

【図1】参考例で使用したDCPC-ATF遺伝子破壊用プラスミド pDATF1 の作製過程を示す。

【図2】IS-5株及びDCPC-ATF遺伝子破壊株の染色体上におけるDCPC-ATF遺伝子並びにその隣接領域の部分制限酵素地図を示す。DCPC-ATFcDNAプローブとハイブリダイズする制限酵素断片の位置\* 50

\*とサイズをそれぞれ地図の下に示している。

【図3】本発明DNA断片の部分制限酵素地図を示す。重複する制限酵素認識部位に関しては、便宜上図中左から右に通し番号を付した。

【図4】本実施例3で使用した $\alpha$ 遺伝子破壊用プラスミド pDAL1の作製過程を示す。

【図5】IS-5株および $\alpha$ 遺伝子破壊株の染色体上にお

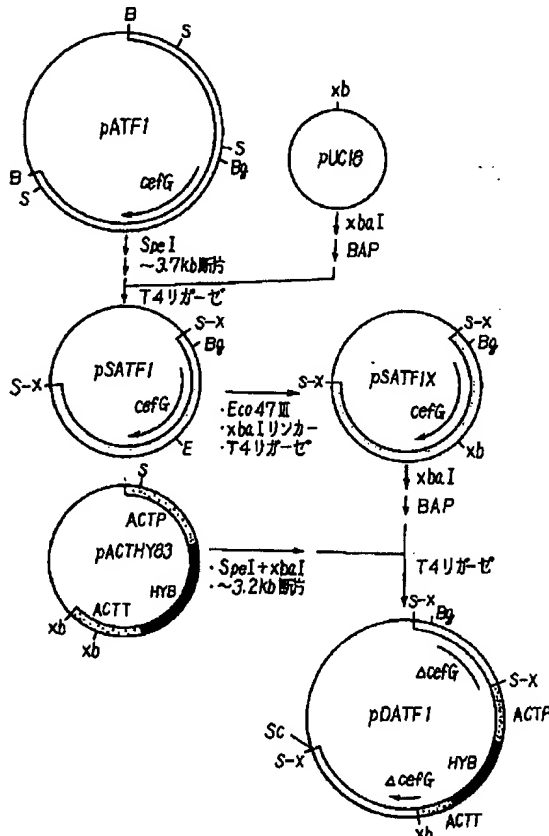
29

る $\alpha$ 遺伝子ならびにその隣接領域の部分制限酵素地図を示す。pIPD1の1.8kbのEcoRV断片プローブとハイブリダイズするEcoRI断片の位置とサイズならびにpALNC1の1.8KbのEcoRV断片とハイブリダイズするSacI断片の位置とサイズをそれぞれ地図の下に示している。

【図6】サザンハイブリダイゼーションの結果を示している。

【図7】本実施例4で使用する $\gamma$ 遺伝子破壊用プラスミドpDNS1の作製過程を示す。なお、図1、図4および図7で使用した略称ないし略号は、以下のとおりのものである。B:BamHI, S:SpeI, Bg:BglII, Xb:XbaI, E:Eco47III, S-X:SpeIとXbaIの連結部位, P:Ps tI, S:SalI, RI:EcoRI, RV:EcoRV, Sn:SnaBI, Sm:SmaI, D:DraI, St:StuI, N:NcoI, Sn-RV:SnaBIとEcoRVの連結部位, Sm-RV:SmaIとEcoRVとの連結部位, St-Sm:StuIとSmaIの連結部位、BAP:アルカリホスファターゼ, cefG:デアセチルセファロスポリンC

【図1】



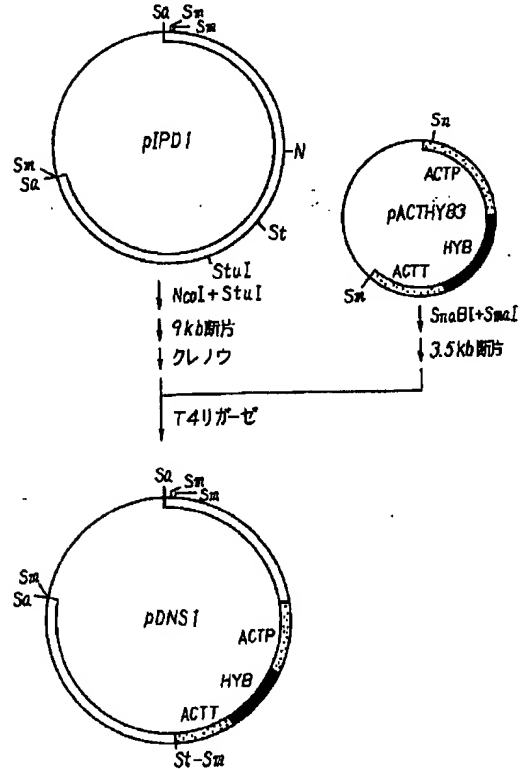
30

アセチルトランスフェラーゼ (DCPC ATF) 遺伝子,  $\Delta$ cefG: DCPC-ATF遺伝子の一部,  $\alpha$ : 本発明により得られた新規遺伝子 $\alpha$ ,  $\Delta\alpha$ :  $\alpha$ 遺伝子の一部, A CTP: アクレモニウム・クリソゲナム由来アクチン遺伝子プロモーター, ACTT: アクレモニウム・クリソゲナム由来アクチン遺伝子ターミネーター, HYB: ハイグロマイシン Bホストトランスフェラーゼ遺伝子。

【図8】IS-5株および $\gamma$ 遺伝子破壊株の染色体上における $\gamma$ 遺伝子ならびにその隣接領域の部分制限酵素地図を示す。pIPD1の1.8KbのEcoRV断片プローブとハイブリダイズするSalI断片の位置とサイズならびにpIPD1の0.35KbのEcoRI断片プローブとハイブリダイズするEcoRI断片の位置とサイズをそれぞれ地図の下に示している。

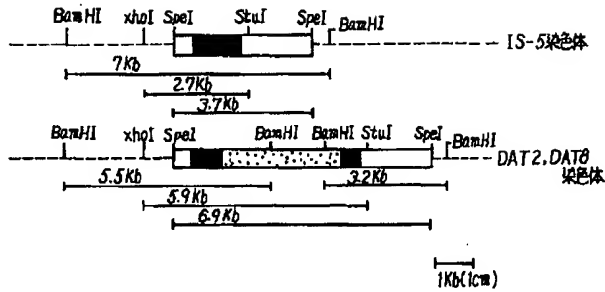
【図9】サザンハイブリダイゼーションの結果を示している。

【図7】



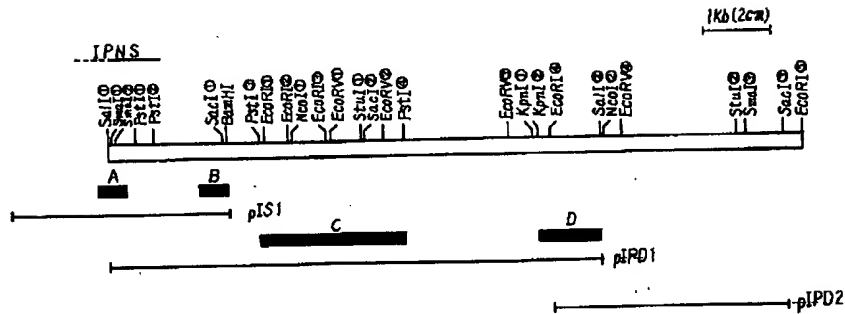


【図2】



- は DCPC-ATF の全コード領域 (2 個のイントロンを含む)
- は pDATF1 に含まれる DCPC-ATF 遺伝子の近接領域
- ▨ は アクレモニウム・クリンゲナム 由来 アクリン 遺伝子の プロモーター、ターミネーター および ハイプロマイシン B ホスホトランスフェラーゼ 遺伝子 からなる マーカー 領域

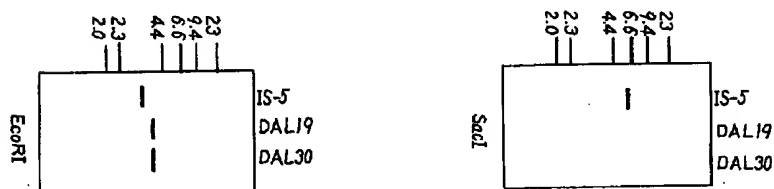
【図3】



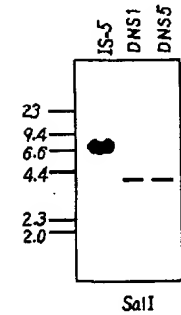
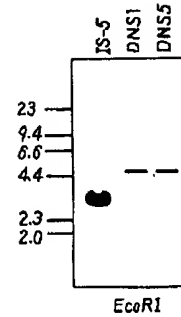
→ は該地図の作成に使用した3種のプラスミド pIPD1, pIPD1, pIPD2 のインサード部分を示す。

■ は実施例2のノーザンハイブリダイゼーションで使用した4種のプローブの位置を示す。なお、SalIからEcoRIまでの間に存在する複数のSalI部位に関しては、その位置を決定していないので記載していない。

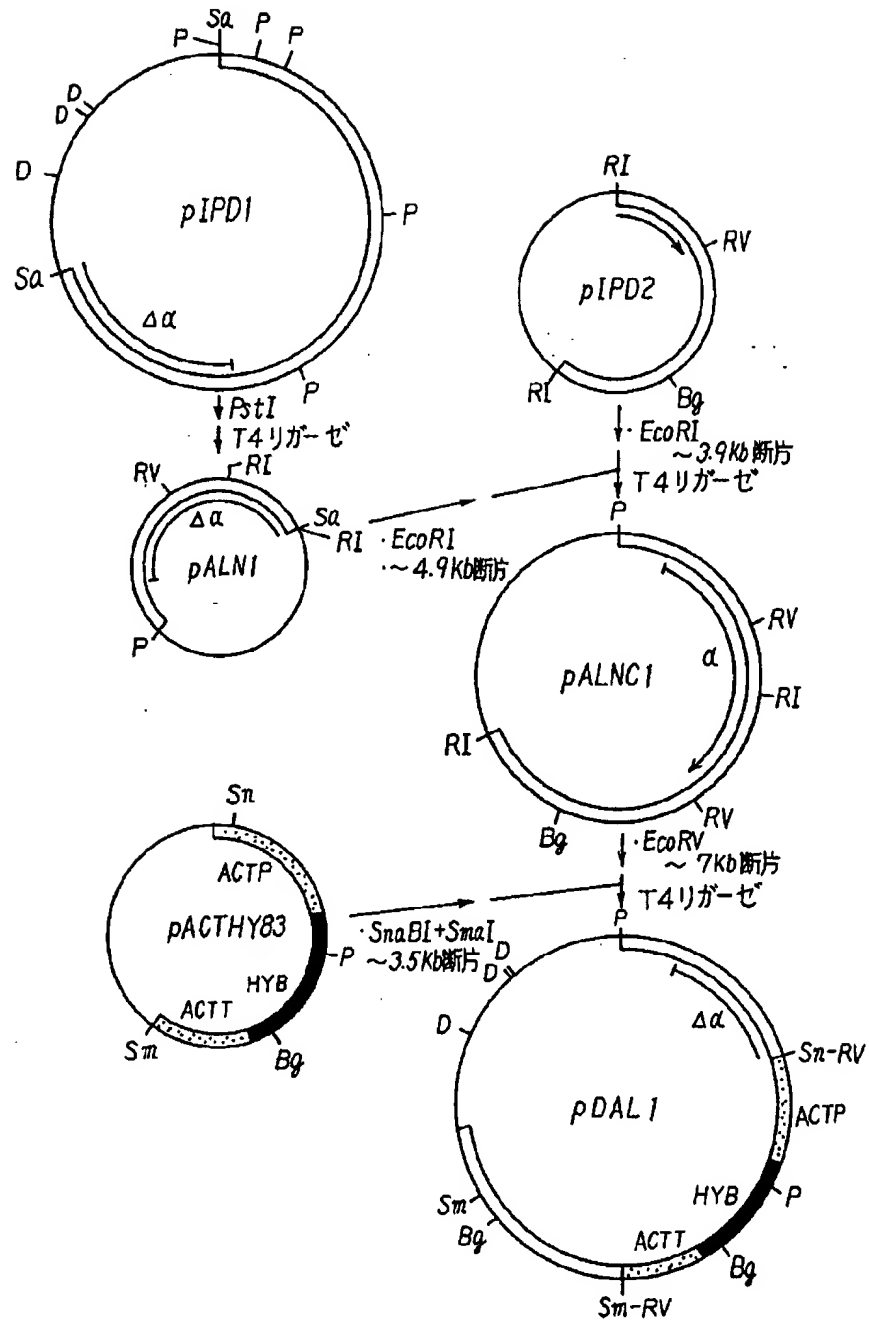
【図6】



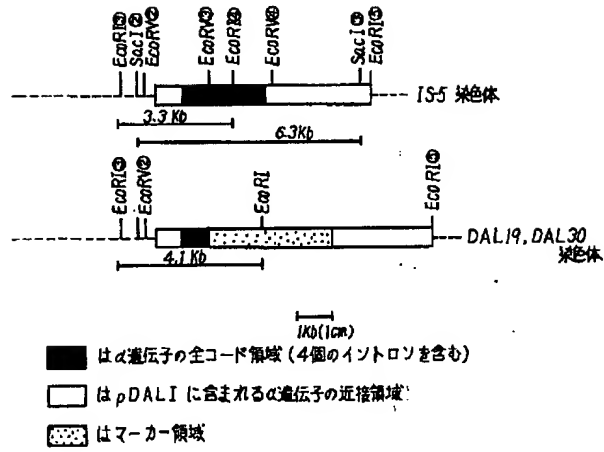
【図9】



【図4】



【図5】



【図8】

